

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

12. 08. 2003

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 35 348.4

REC'D 25 AUG 2003

WIPO PCT

Anmeldetag:

03. Juli 2002

Anmelder/Inhaber:

Martina B ö h m , Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung:

Verfahren zum Nachweis der ADAMTS13-Aktivität im
Blutplasma

IPC:

C 12 Q 1/37

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
im Auftrag

Sticht

5 Verfahren zum Nachweis der ADAMTS13-Aktivität im Blutplasma

- 10 Gegenstand der Erfindung ist ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der vWF-spaltenden ADAMTS13-Aktivität im Blutplasma.

Die thrombotische, thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine Erkrankung, bei der die klassischen Symptome der Thrombozytopenie, der mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie, neurologische Symptome, Nierenstörungen und Fieber beobachtet werden. Ungewöhnlich große Molekülaggregate des von Willebrand-Faktors (vWF) werden im Plasma von TTP-Patienten gefunden und als Ursache für die Bildung von vWF- und Blutplättchen-reichen Thromben angesehen. Der von Willebrand-Faktor wird von Endothelzellen in Form von großen Molekülaggregaten freigesetzt, die im normalen Plasma durch das Zusammenwirken einer Reduktase und einer Metalloprotease gespalten werden.

Es ist außerdem bereits bekannt, dass ein Mangel an einer spezifischen Metalloprotease, die den vWF zwischen den Peptidbindungen Tyr842 und Met843 spaltet, bei Patienten mit angeborener und erworbener TTP beobachtet wird. Diese Metalloprotease ist kürzlich in reiner Form isoliert, als ein neues Mitglied der ADAMTS-Familie identifiziert und dann als ADAMTS13 bezeichnet worden (1, 2). Unabhängig davon wurde durch eine Genomanalyse (3) in vier verschiedenen menschlichen Stammbäumen mit angeborener TTP das für den Proteasemangel verantwortliche Gen auf Chromosom 9q34 lokalisiert und als neues Mitglied der ADAMTS-Familie identifiziert.

Die vWF-spaltende Proteaseaktivität von ADAMTS13 wird normalerweise durch Inkubation einer vWF-Probe mit verdünntem Plasma bei niedriger Ionenstärke in Gegenwart eines zweiwertigen Metallions und Harnstoffs oder Guanidinhydrochlorids gemessen. Der Nachweis der Proteolyse wird durch eine Meranalyse mittels der SDS-Agarosegelelektrophorese oder durch Bruchstück-

- 5 analyse mit SDS-PAGE und anschließendem Immun-Blotting, also dem Nachweis der Proteine auf einer Cellulosemembran mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt (4, 5). Der Abbau des von Willebrand-Faktors kann auch durch die Messung der Kollagen-Bindungsaktivität des vWF oder durch einen spezifischen ELISA-Nachweis ermittelt werden. Kürzlich ist auch ein rekombinanter, monomerer vWF, der am N-Terminus mit dem Grünfluoreszierenden Protein markiert worden ist, zur Bestimmung der Proteolyse eingesetzt worden.

- 15 Da sich inzwischen gezeigt hat, dass auch bei anderen Krankheiten als bei TTP geringe Proteaseaktivitäten für vWF zu beobachten sind, stellte sich die Aufgabe, ein verbessertes, schnelles und einfaches Verfahren zum in-vitro-Nachweis der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 zu entwickeln, das auch erlaubt, den für TTP charakteristischen schweren Proteasemangel von einem milden Proteasemangel zu differenzieren, welcher als Begleiterscheinung auch bei anderen Krankheiten auftritt. Ein derartiges Verfahren sollte auch eine Überwachung der Therapie von TTP-Patienten sowie eine zuverlässige Quantifizierung der Proteaseaktivität in beliebigen Medien ermöglichen.

- 25 Es wurde nun gefunden, dass diese Aufgabe durch ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der proteolytischen Aktivität der Protease ADAMTS13 im Blutplasma gelöst wird, bei dem man Blutplasma mit einer physiologischen Menge eines von ADAMTS13-Aktivität freien von Willebrand-Faktors (vWF) versetzt und nach ausreichender Inkubation den Abfall der vWF-Aktivität durch dessen verminderte Fähigkeit zur Aggregation von Blutplättchen feststellt.

- 30 Diese Methode beruht auf der Wechselbeziehung zwischen der Größe des multimeren vWF und dessen Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (RCO:C). Die neue Methode wurde ausführlich mit der Immun-Blotting-Methode verglichen. Das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren wurde zur Ermittlung der Aktivität der den von Willebrand-Faktor spaltenden Protease (ADAMTS13) an 14 TTP-Patienten während akuter Anfälle, im Verlauf der Therapie und in Remission, außerdem in 35 80 gesunden Probanden sowie in 23 Patienten mit Thrombozytopenie und/oder

- 5 Hämolysen und in 14 Patienten mit dem Antiphospholipidsyndrom (APS) eingesetzt.

Dabei wurde in folgender Weise vorgegangen:

10 **1. Plasmaproben**

Mit Zitrat versetzte Plasmaproben wurden von 14 Patienten bei 22 akuten TTP-Anfällen vor dem Plasmaaustausch mit frischgefrorenem Plasma gewonnen. Die anfängliche Diagnose basierte auf klinischen Symptomen (vor allen neurologischen Störungen) und Laborbefunden wie schwerer Thrombozytopenie und dem Nachweis einer mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie. Von 11 Patienten wurden auch Plasmaproben in Remission gewonnen. Von 10 Patienten konnte auch Blut während der Plasmaaustauschtherapie erhalten werden. Außerdem wurden Plasmaproben von 23 Patienten mit akuter Thrombozytopenie und/oder Hämolysen, 14 Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom und 80 gesunde Probanden analysiert. Blutplättchenarmes Plasma wurde durch Zentrifugation über 40 Minuten bei 4°C und 2500 g hergestellt. Der Überstand wurde anschließend bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

25 **2. Bestimmung der vWF-spaltenden Aktivität durch die erfindungsgemäße Ristocetin-Cofaktor-Methode**

Plasmaproben wurden 1:21 verdünnt (Endvolumen 210 µl) mit 5 mM Tris-HCL-Puffer, pH 8, der 12,5 mM Bariumchlorid (BaCl₂) und 1 mM PefaBloc SC, einem Inhibitor von Serumproteasen (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) versetzt und dann 5 Minuten bei 37°C zur Aktivierung der Protease inkubiert. Als Substrat wurde ein gereinigter vW-Faktor (Concendre de Facteur Willebrand Humain Tres Haute Purité, LFB France) eingesetzt. Das Konzentrat, welches völlig frei von einer vWF-spaltenden Proteaseaktivität war, wurde mit aqua ad iniectionem auf eine Konzentration von 100 U/ml rekonstituiert, aufgeteilt und bei -20°C bis zu Verwendung gelagert. Vor der Einwirkung der Protease wurde das Substrat aufgetaut, im Verhältnis 1:20 mit 5 M Harnstoff in 5 mM Tris-HCl, pH 8

5 verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl der Substratlösung zum verdünnten Plasma gegeben und über Nacht bei 37°C einwirken gelassen. Danach wurde die restliche Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (RCO:C) mit einem kommerziellen Test von Dade Behring, Marburg, ermittelt. Die vWF-spaltende Aktivität einer von 80 offensichtlich gesunden erwachsenen
10 Personen gewonnenen Plasmamischung in einer Verdünnung von 1:21 wurde als 100% definiert. Zur Eichung wurden Reihenverdünnungen des Plasmapools mit hitzebehandeltem Plasmapool hergestellt. Für die Hitzebehandlung wurde der Plasmapool 30 min bei 60°C inkubiert und anschließend 5 min bei 13000 UPM (Biofuge A, Heraeus) zentrifugiert, um Proteinaggregate zu sedimentieren.
15 Das so behandelte Plasma enthielt keine detektierbare vWFspaltende Proteaseaktivität. Die verschiedenen Verdünnungen wiesen somit definierte, prozentuale Mengen an vWF-spaltender Proteaseaktivität auf, welche gegen die verbleibende Ristocetin-Cofaktor-Aktivität aufgetragen wurde. Die so gewonnene Eichkurve ist in Fig. 1 (A) dargestellt.

20

3. Bestimmung der vWF-spaltenden Aktivität durch die Immun-Blotting-Methode

Zur Messung der vWF-spaltenden Proteaseaktivität durch die Immun-Blotting-Methode wurde eine Variante der zuerst von Furlan et al. und Tsai (4, 5) beschriebenen Methode verwendet. Plasmaproben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5 mM Tris-Puffer, pH 8 einschließlich 12,5 mM BaCl₂ und 1 mM PefaBloc SC verdünnt und die Aktivierung und Einwirkung der Protease in gleicher Weise durchgeführt, wie es für den Ristocetin-Cofaktor-Test beschrieben ist. Die Re-
25 aktion wurde durch Zugabe von Dinatrium-EDTA bis zu einer Endkonzentration von 23,5 mM gestoppt. Die Multimeranalyse wurde durch SDS-Elektrophorese auf einer 1,4%-igen Agarose (Seakem HGT von Biozym Diagnostics, Hess. Oldenburg, Deutschland) durchgeführt und zum Immun-Blotting wurde ein mit Peroxidase konjugierter Anti-vWF-Antikörper (P0226 von Dako-Glostrup, Däne-
30 mark) eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung wurden Reihenverdünnungen von normalem Plasma getestet, wie es bereits vorstehend beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 (B) gezeigt.

35

5

4. Inhibitortest

Zur Testung der inhibitorischen Aktivität gegen die vWF spaltende Protease (ADAMST13) wurden Plasmaproben, entweder rein oder verdünnt mit hitzbe-

10 handeltem Plasmapool, mit gleichen Anteilen Plasmas gesunder Personen gemischt. Zum Vergleich wurde das Plasma 1:1 mit hitzebehandeltem Plasmapool gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde in den Mischungen die vWF spaltende Aktivität mit der erfindungsgemäßen Ristocetin-Cofaktor-Methode oder der Immuno-Blott-Methode bestimmt. Die vWF spaltende Proteaseaktivität der Testprobe wurde durch die Aktivität der Vergleichsmischung geteilt und mit 100 multipliziert, um die Restaktivität der vWF spaltenden Protease zu ermitteln. Zur quantitativen Bestimmung wurden Proben mit einer Restaktivität von 25 bis 75% ausgewählt und die Menge des Inhibitors, wie es für Inhibitoren des Blutgerinnungsfaktors VIII beschrieben ist, ermittelt

15 (6). Eine Probe, die eine Inhibition der normalen vWF-spaltenden Aktivität von 50% verursacht, enthielt definitionsgemäß 1 U/ml Inhibitor.

20

5. Ergebnisse

25 Genauigkeit und Wiederholbarkeit des Ristocetin-Cofaktor Tests

Die Genauigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde bewiesen, indem 282 Plasmaproben von Patienten und gesunden Personen mittels beider Methoden getestet wurden. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt und zeigen die

30 gute Übereinstimmung der neuen Methode mit der herkömmlichen Immun-Blotting Methode. Dort wird gezeigt, dass das Immun-Blotting Verfahren die Einordnung der Plasmaproben in folgende Kategorien ermöglicht: Schwerer Proteasemangel (<12,5%); mittelschwerer Proteasemangel (12,5 – 25%); milder Proteasemangel (25 – 50%); normale Proteaseaktivität (>50%). Bei 72

35 Plasmaproben mit schwerem Proteasemangel (<12,5%) wurden übereinstimmende Ergebnisse nach beiden Methoden erhalten. Bei 19 Plasmaproben, die nach der Immun-Blotting Methode einen mittelschweren Proteasemangel zeig-

5 ten, wurden mit der Ristocetin-Cofaktor Methode Proteaseaktivitäten von 9 bis 39% festgestellt, während bei 64 Plasmaproben, die nach der Immun-Blotting Methode einem milden Proteasemangel zeigten, mit der Ristocetin-Cofaktor Methode Proteaseaktivitäten zwischen 20 und 60% gemessen wurden. 127 Proben zeigten nach beiden Methoden normale Proteaseaktivitäten. Die erziel-

10 ten Ergebnisse wurden auf der y-Achse von Fig.2 aufgetragen.

Die erfindungsgemäße Methode ist reproduzierbar, wie sich durch die sehr geringen Fehlergrenzen innerhalb einer Testreihe und zwischen verschiedenen Testreihen zeigt. Die klinische Anwendbarkeit der neuen Methode konnte durch

15 die an 52 Patienten erzielten Messergebnisse gezeigt werden, wobei 22 Anfälle von akuter TTP sowie andere thrombotische, thrombozytopenische oder hämolytische Erkrankungen untersucht wurden. Ein schwerer Mangel an der den vWF-spaltenden Protease (ADAMTS13) wurde nur bei Patienten mit akuter klassischer TTP beobachtet. Patienten mit niedrigen Inhibitorkonzentrationen

20 reagierten auf den Plasmaaustausch mit einem Anstieg der vWF-spaltenden Aktivität, während der Mangel an der vWF-spaltenden Protease in Patienten mit hoher Inhibitorkonzentration bestehen bleibt, obwohl die Plasmaaustausch-Therapie zur klinischen Remission führt.

25 Das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren erlaubt die Messung der vWF-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS13. Der Vergleich des erfindungsgemäßen Assays mit dem bekannten Immun-Blotting-Verfahren zeigt die Genauigkeit des erfindungsgemäßen Ristocetin-Cofaktor-Verfahrens. Das erfindungsgemäße Verfahren ist reproduzierbar und erfordert im Gegensatz zur herkömmlichen Immun-Blotting Methode keine spezielle Laborausrüstung oder besondere

30 Erfahrung. Es kann über Nacht durchgeführt werden und ist deshalb weniger zeitaufwendig, als das Immun-Blotting. Die Methode erlaubt eine schnelle Diagnose und einen alsbaldigen Beginn der Therapie, was für eine erfolgreiche Behandlung eines akuten Anfalls wesentlich ist.

35 Mit der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, dass die Verwendung eines Reagenzes zum Nachweis der vWF-Aktivität zum Nachweis der Detektion der vWF-

- 5 spaltenden Aktivität von ADAMTS13 geeignet ist und sich damit auch andere Erkrankungen sicher diagnostizieren lassen könnten, falls sie auf einen Mangel der Protease ADAMTS13 zurückgeführt werden müssen.

- 10 Mit dem erfindungsgemäßen diagnostischen Verfahren kann in jedem normal ausgestatteten Gerinnungslabor eine schnelle und sichere Diagnose der TTP erfolgen. Die schnelle Diagnose erniedrigt die Anzahl der notwendigen Plasmaaustauschbehandlungen, was die Kosten der Therapie ganz erheblich erniedrigt.

5 Literaturverzeichnis:

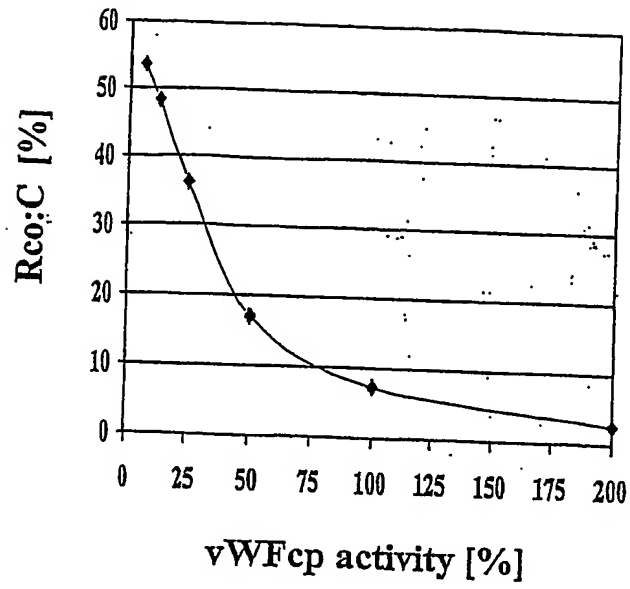
- 10 1. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., Chung, D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. Blood 98: 1662 – 1666.
- 15 2. Gerritsen; H.E., Robles, R., Lämmele, B., Furlan, M. (2001) Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease Blood 98: 1654 – 1661.
- 20 3. Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C. Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, DR., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V., Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D., Ginsburg, D., Tsai, H.M. (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 413: 488 – 494.
- 25 4. Furlan, M., Robles, R., Lämmele, B., (1996) Partial purification and characterisation of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. Blood 10: 4223 – 4234.
- 30 5. Tsai, H.M. (2000) Physiologic Cleavage of von Willebrand factor by a Plasma Protease is dependent on its confirmation and requires Calcium ion. Blood 10: 4235 – 4244.
6. Kasper, C.K. (1991) Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. Blood Coagul Fibrinolysis 2: 7 – 10.

5 Patentansprüche:

- 10 1. Diagnostisches Verfahren zum Nachweis der vWF spaltenden Aktivität von ADAMTS13 im Blutplasma, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Blutplasma mit einer physiologischen Menge eines von ADAMTS13-Aktivität freien von Willebrand Faktors (vWF) versetzt und nach ausreichender Inkubation den Abfall der vWF-Aktivität durch dessen verminderte Fähigkeit zur Aggregation von Blutplättchen feststellt.
- 15 2. Verwendung eines Reagenzes zum Nachweis der vWF-Aktivität zur Detektion der Protease ADAMTS13.

Fig.1

(A)



(B)

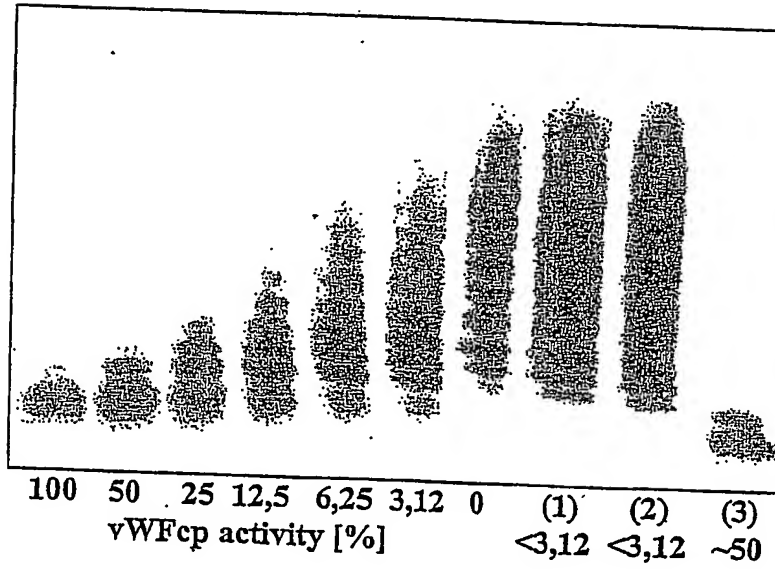
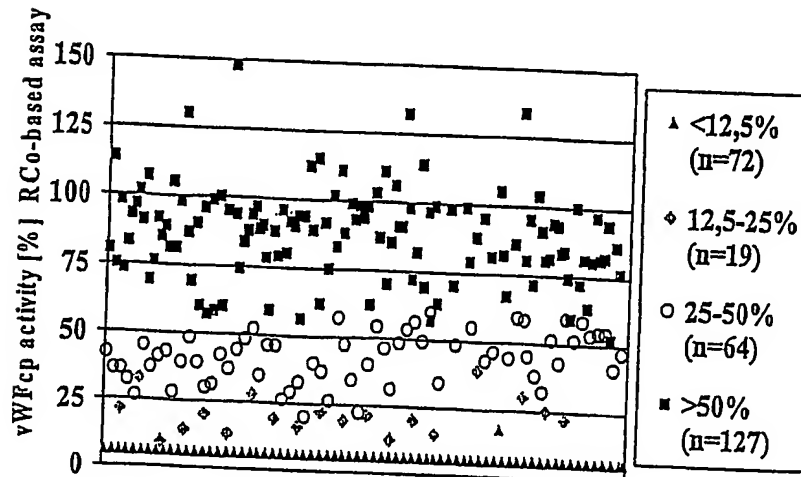


Fig.2



5 Martina Böhm
Oswaltstraße 23

60439 Frankfurt am Main

10

Zusammenfassung:

Verfahren zum Nachweis der ADAMTS13-Aktivität im Blutplasma

Es wird ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der vWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS13 im Blutplasma beschrieben, bei dem man Blutplasma mit einer physiologischen Menge eines von ADAMTS13 aktivitätsfreien von Willebrand Faktor versetzt und nach ausreichender Inkubation den Abfall der vWF-Aktivität durch dessen verminderte Fähigkeit zur Aggregation von Blutplättchen misst.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.